

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“ Χωρική διαφοροποίηση της παρουσίας του βακτηρίου
Salmonella spp. στον ταμιευτήρα της Κάρλας”**

Σταμοπούλου Θεανώ

ΒΟΛΟΣ 2017

“ Χωρική διαφοροποίηση της παρουσίας του βακτηρίου
Salmonella spp. στον ταμιευτήρα της Κάρλας”

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Κωνσταντίνος Κορμάς**, Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
- 2) Ήρα Καραγιάννη**, Λέκτορας, Λιμνολογία, Υδροβιολογία, Τμήμα Βιολογικών Τεχνικών και Εφαρμογών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Μέλος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα αυτής της εργασίας, κ. Κορμά Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθεια και τη διαρκή υποστήριξή του τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μποζιάρη Ιωάννη για την προμήθεια εργαστηριακού υλικού και την κα. Παρλαπάνη Φωτεινή για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθεια της κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ'όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της χωρικής διαφοροποίησης του βακτηριού *Salmonella* στον ταμιευτήρα της Κάρλας καθώς και η εξακρίβωση της επιβιωσιμότητας του συγκεκριμένου βακτηρίου σε υφάλμυρο νερό. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες νερού από τρία σημεία του ταμιευτήρα και μία δειγματοληψία νερού από τον Παγασητικό Κόλπο και πιο συγκεκριμένα από την περιοχή της παραλίας του Αναύρου.

Το στέλεχος εμφάνισε αυξημένη επιβιωσιμότητα στα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με νερό από την αποστραγγιστική τάφρο (σταθμός X), τόσο κατα την πρώτη – μη αραιωμένη φάση του πειράματος όσο και κατα την δεύτερη, όπου πραγματοποιήθηκε αραιώση της τάξης 10^{-1} ml με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό στις αρχικές καλλιέργειες. Η τρίτη επανάληψη του πειράματος που πραγματοποιήθηκε τον Σεπτέμβριο του 2014 έδειξε μηδενική επιβιωσιμότητα του βακτηρίου και για τους τρεις σταθμούς (K, 2T, X), τόσο στην πρώτη όσο και στη δεύτερη πειραματική φάση.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που συλλέχθηκαν έδειξε πως δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων.

Λέξεις κλειδιά : *Salmonella*, επιβιωσιμότητα, λίμνη Κάρλα, υφάλμυρο νερό , υδροφόρος ορίζοντας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1.Θαλασσινό νερό.....	1
1.2. Η Λίμνη Κάρλα.....	3
1.3. Οικογένεια Enterobacteriaceae.....	5
1.3.1. Σαλμονέλα <i>Salmonella spp</i>	7
1.3.1.1 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες.....	9
1.4. Σκοπός	10
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	11
2.1. Περιοχή μελέτης.....	11
2.2. Δειγματοληψία - Πείραμα.....	12
2.3. Το θρεπτικό υλικό BGA.....	13
2.3.1. Βασικές αρχές της διαδικασίας παραγωγής BGA	14
2.4. Στατιστική επεξεργασία	16
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ–ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	17
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	23
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	24
6. ABSTRACT.....	29

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Θαλασσινό νερό

Το θαλασσινό νερό περιέχει μεγάλο βαθμό βακτηρίων. Αυτοί οι μονοκύτταροι οργανισμοί, μεγέθους <5 μ και διαφορετικών σχημάτων (κόκκου, βακίλου ή και σπειριλίου) απαντώνται παντού στη φύση και βρίσκονται σε μεγάλες αφθονίες και στο θαλασσινό νερό. Η πλειονότητα αυτών αποτελεί μέρος της φυσικής βιοκοινότητας του νερού (αυτόχθονοι μικροοργανισμοί), ενώ κάποιοι άλλοι καταλήγουν στη θάλασσα μέσω φυσικών φαινομένων (άνεμος, βρόχινες απορροές, διάβρωση ακτών) αλλά και μέσω ανθρώπινων δραστηριοτήτων (απόβλητα, αστικά λύματα) και χαρακτηρίζονται ως αλλόχθονοι μικροοργανισμοί.

Τα βακτήρια δεν θεωρούνται μόνο αποικοδομητές της νεκρής οργανικής ύλης αλλά και ζωτικός συνδετικός κρίκος της ζωής στη θάλασσα μεταφέροντας και διοχετεύοντας ένα μεγάλο μέρος του άνθρακα, που διαφορετικά θα χάνονταν. Έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν ως τροφή διαλυμένο οργανικό υλικό, στη συνέχεια αποτελούν τροφή για κάποιες κατηγορίες πλαγκτού (μαστιγωτά, βλεφαριδωτά), όπου και αυτό με την σειρά του καταναλώνεται από ανώτερους οργανισμούς, φτάνοντας μέχρι τα ψάρια. Πρόκειται για την θεωρία του μικροβιακού τροφικού πλέγματος σύμφωνα με την οποία ο Azam (1998) υπογράμμισε ότι 50% του άνθρακα στη θάλασσα ανακυκλώνεται μέσω βακτηρίων, χωρίς την παρουσία των οποίων οι ωκεανοί θα μετατρέπονταν σε μία τεράστια έρημο. Το μικροβιακό τροφικό πλέγμα χαρακτηρίζει κυρίως θαλάσσια οικοσυστήματα με έλλειψη θρεπτικών (ολιγοτροφικά), όπως αυτό της

Μεσογείου, όπου φαίνεται ότι η βακτηριακή βιομάζα ξεπερνάει αυτή του φυτοπλαγκτού (Belkin et al. 2015).

Όπως προαναφέρθηκε, εμφανίζεται συχνά σε χαρακτηριζόμενες ως ρυπασμένες περιοχές και ένας αριθμός αλλόχθονων βακτηρίων, που μπορεί να περιλαμβάνουν παθογόνους ή δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς. Αν οι μικροοργανισμοί αυτοί βρούν οδούς εισόδου και εγκατασταθούν στο ανθρώπινο σώμα μπορούν να προκαλέσουν τις λεγόμενες θαλασσογενείς λοιμώξεις. Τα βακτήρια που ενοχοποιούνται είναι συνήθως τα *Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* καθώς και πλήθος άλλων (Efstratiou 2001), όπου η παρουσία μόνο μερικών ή εκατοντάδων/ml στο νερό είναι αρκετή για να εκδηλώσουν την παθογόνο δράση τους. Μελέτες που άρχισαν από την δεκαετία του 1960 έδειξαν ότι ο αριθμός των λυματικών βακτηρίων που καταλήγουν στη θάλασσα μειώνεται πολύ γρήγορα με την πάροδο του χρόνου. Λίγες ώρες αρκούν για να εξουδετερωθεί το 90% του αρχικού πληθυσμού (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου, 1995).

Οι παράγοντες που συντελούν στην εξαφάνισή τους και συνεπώς στον “αυτοκαθαρισμό” ενός θαλάσσιου οικοσυστήματος είναι :

- Φυσικοί (φυσική αραίωση, ηλιακή ακτινοβολία και θερμοκρασία)
- Χημικοί (pH, αλατότητα και η έλλειψη απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων)
- Βιολογικοί (διαειδικός ανταγωνισμός)

Γενικότερα τα παθογόνα βακτήρια που εντοπίζονται στη Μεσόγειο και ειδικότερα στο Αιγαίο είναι :

- Σαλμονέλες (*S. typhi*, *S. paratyphi* και λοιπά είδη του γένους *Salmonella* spp.).

- Δονάκια (*Vibrio*) , όπως το *V. cholerae* (Δονάκιο της χολέρας), το *V. fluvialis*, το *V. metschnikovii*, το *V. alginolyticus*.
- Σταφυλόκοκκοι χρυσίζοντες ή επιδερμικοί (*S. aureus*, *S. epidermidis*)
- Ψευδομονάδες με κυριότερο εκπρόσωπο το *Pseudomonas aeruginosa*
- *Clostridium perfringens*
- Καμπυλοβακτηρίδια (*C. jejuni* ή το *C. coli*).
- *Yersinia enterocolitis*
- *Aeromonas hydrophila*
- Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli*
- Στρεπτόκοκκοι της ομάδας D

1.2 Λίμνη Κάρλα

Η λίμνη Κάρλα ήταν ένας από τους πιο ιδανικούς μεσογειακούς υγροτόπους, με υψηλή βιοποικιλότητα και ζωντανό πολιτισμό. Κατά την δεκαετία του 1960 η λίμνη αποξηράνθηκε προκειμένου να εξασφαλιστεί η απαραίτητη έκταση γης για γεωργικές καλλιέργειες και την κτηνοτροφία. Πριν την αποξήρανσή της ήταν μια φυσική δεξαμενή, η οποία παρείχε σημαντικά αποθέματα νερού και αναζωογονούσε τα υπόγεια ύδατα. Σήμερα η λίμνη Κάρλα έχει μερικώς αποκατασταθεί, αντιμετωπίζοντας διάφορες ανθρωπογενείς πιέσεις ενώ αναφέρεται στο δίκτυο των ελληνικών προστατευόμενων περιοχών αναφορικά με την αξία διατήρησής του.

Αξίζει να αναφέρουμε μια πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την ανασύσταση της λίμνης, όπου βρέθηκε ότι ο μέσος όρος συγκέντρωσης της

χλωροφύλλης είναι τέτοιος ώστε να κατατάσσει τη λίμνη στις ευτροφικές (Theologou et al. 2016).

Το υψόμετρο της περιοχής κυμαίνεται από 50 m έως και πάνω από 2000 m ενώ το μέσο υψόμετρο φτάνει τα 230 m. Το κλίμα της περιοχής θεωρείται ηπειρωτικό με κρύους και υγρούς χειμώνες και θερμά και ξηρά καλοκαίρια. Οι μέσες ετήσιες κατακρημνίσεις στην λεκάνη απορροής της λίμνης είναι περίπου 560 mm και παρουσιάζουν ανομοιόμορφη κατανομή στο χώρο αλλά και στον χρόνο. Η μέση ετήσια δυνητική εξατμισοδιαπνοή είναι περίπου 775 mm και η μέση ετήσια θερμοκρασία φτάνει τους 14,3°C (Vasiliades et al. 2009).

Η λίμνη Κάρλα χαρακτηρίζεται από μικρό βάθος (μέσο βάθος 2 m) ενώ το μέγιστο βάθος της φτάνει τα 4,5 m. Σήμερα κύρια πηγή νερού για τη λίμνη αποτελεί ο Πηνειός ποταμός. Επίσης δέχεται επιφανειακή απορροή από την περιβάλλουσα, κυρίως αγροτική, περιοχή και εισροές από ρέματα της γύρω ορεινής περιοχής. Η λίμνη Κάρλα δεν διαθέτει φυσική εκροή (Chamoglou et al. 2014). Επηρεάζεται αρνητικά από παρακείμενες αγροτικές και βιομηχανικές δραστηριότητες λειτουργώντας σαν αποδέκτης λιπασμάτων και αγροτικών λυμάτων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η λίμνη Κάρλα ήταν ένας υγρότοπος που προστατευόταν από τη σύμβαση για τους υγροτόπους Διεθνούς σημασίας (Συνθήκη Ραμσάρ) , ενώ παράλληλα ένα μεγάλο μέρος της λεκάνης απορροής του Πηνειού είναι περιοχή προστατευόμενη από το δίκτυο Natura. Ωστόσο κανένα από τα προαναφερθέντα προστατευτικά καθεστώτα δεν ήταν ικανό να προστατεύσει τη λίμνη Κάρλα (Gialis & Laspidou, 2014) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Εκατοντάδες νεκρά ψάρια στην όχθη της Λίμνης Κάρλας, εξαιτίας της κακής ποιότητας και της ανεπαρκούς στάθμης του νερού. Οκτώβριος 2013 (Gialis & Laspidou, 2014)

1.3 Οικογένεια Enterobacteriaceae

Η οικογένεια αυτή είναι η είναι η μεγαλύτερη ομάδα από τα μη φωτοσυνθετικά Gram αρνητικά βακτήρια. Είναι όλα ραβδοειδή ευθύγραμμα ή καμπυλοειδή, ορισμένα είναι ακίνητα ενώ τα περισσότερα κινούνται με μαστίγια που μπορεί να είναι περίτριχα, πολικά ή μεικτού τύπου (πολικά και περίτριχα). Η κατανομή της δίνει τη δυνατότητα διάκρισης αυτών των βακτηρίων με την προαιρετική αναερόβια ανάπτυξη. Σε αναερόβιες συνθήκες η ενέργεια προέρχεται από τη ζύμωση σακχάρων ενώ σε αερόβιες συνθήκες, για την οξειδωτική αναπνοή, χρησιμοποιείται μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων (οργανικά οξέα, αμινοξέα, υδατάνθρακες). Ο πιο συνηθισμένος τύπος ζύμωσης στα εντεροβακτήρια είναι η ζύμωση μείγματος οξέων (mixed acid fermentation) με την οποία σχηματίζονται τα οξέα γαλακτικό, οξικό, ηλεκτρικό και

μυρμηγκικό (ή CO₂ και H₂) καθώς και αιθυλική αλκοόλη (Holt, 1974). Ο σχηματισμός αερίου σαν αποτέλεσμα της ζύμωσης του σακχάρου είναι ιδιότητα χρήσιμη για την ταυτοποίηση των διάφορων μελών των εντεροβακτηρίων: το γένος *Escherichia* που συσσωρεύει αέρια, αναγνωρίζεται από τα παθογόνα της του γένους *Shigella* και από το είδος *Salmonella typhi* τα οποία ζυμώνουν τα σάκχαρα χωρίς να δημιουργούν αέρια. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται καλά στους 37°C. Ωστόσο πολλά είδη αναπτύσσονται καλύτερα στους 25-30°C και είναι συχνά περισσότερο ενεργά μεταβολικά σε αυτές τις θερμοκρασίες. Τα εντεροβακτήρια είναι αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στην δοκιμή της καταλάσης εκτός από τη *Yersinia dysenteriae* και είδη του γένους *Xenorhabdus* όπως το *X. uminescens* (Katsogianopoulos, 1996). Η κατανομή τους είναι σε παγκόσμιο επίπεδο. Βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, τα φυτά και τα δέντρα και στα ζώα από τα σκουλήκια και τα έντομα μέχρι και τον άνθρωπο (Vassos, 2004).

Με βάση κριτήρια βιοχημικά (όπως το αν παράγεται το ένζυμο καταλάση και οξειδάση), μορφολογικά (τύπος μαστιγίων) και γενετικά (ομόλογες αλληλουχίες βάσεων), η οικογένεια Enterobacteriaceae περιλαμβάνει τα παρακάτω γένη (Holt, 1974): *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Habnia*, *Serratia*, *Erwinia*, *Arsenophonus*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Ewingella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pragia*, *Providencia*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Yokenella*, *Xenorhabdus*. Ενδιαφέρον για την μικροβιολογία παρουσιάζουν κυρίως τα γένη : *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* και *Erwinia*.

1.3.1 Σαλμονέλα *Salmonella* spp.

Ο Ebert και ο Koch το 1880 απομόνωσαν το μικροοργανισμό που προκαλεί τον κοιλιακό τύφο του ανθρώπου. Το 1885 ο Salomon, από το όνομα του οποίου το γένος του μικροοργανισμού ονομάστηκε *Salmonella*, απομόνωσε το *Salmonella choleraesuis*.

Το *Salmonella* ανήκει στα πρωτεοβακτήρια και αρνητικά κατά Gram βακτήρια και είναι το γένος παθογόνων, ραβδόμορφων βακτηρίων, που προκαλούν σαλμονέλωση (ασθένεια του εντέρου και του στομάχου). Οι δύο κυριότερες κατηγορίες είναι η τυφική και η μη τυφική σαλμονέλωση. Η τυφική σαλμονέλωση προκαλείται από στελέχη του είδους *S. bongori*, όπως το υποείδος *S. typhi*, ενώ στελέχη του *S. enteric*, όπως το υποείδος *S. typhimurium*, προκαλούν γαστρεντερίτιδα. Τα στελέχη του *S. typhimurium* θεωρούνται γενικευμένοι ξενιστές που απαντώνται και στον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και σε άλλα είδη θηλαστικών (Εικόνα 2), σε αντίθεση με τα στελέχη του *S. typhi* που είναι ειδικευμένοι ξενιστές και προσβάλουν μόνο τους ανθρώπους. Η λοίμωξη από σαλμονέλα προκαλείται, όταν το βακτήριο διεισδύει στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου όπου προκαλεί φλεγμονή, με αποτέλεσμα να παραχθούν εντεροτοξίνες στα εντερικά κύτταρα. Το παθογόνο αυτό βακτήριο βρίσκεται στο νερό, στο χώμα, στα ζωικά περιττώματα, στα πουλερικά, στα θαλασσινά και σε επιφάνειες εργοστασίων.



Εικόνα 2 : Ενισχυμένη με χρώμα μικρογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σαρώσεως που δείχνει το βακτήριο *Salmonella typhimurium* (κόκκινο χρώμα) να εισβάλλει σε καλλιεργημένα ανθρώπινα κύτταρα (RockyMountainLaboratories, NIAID, NIH).

Το *Salmonella* μαζί με άλλα εντεροβακτήρια του γένους *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* και *Shigella*, μπορούν να μεταφέρουν το πλασμίδιο R100. Το πλασμίδιο αυτό αποτελείται από 94,3 κιλοβάσεις ζευγών νουκλεοτιδίων και διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας στις σουλφοναμίδες, στη στρεπτομυκίνη και τη σπεκτινομυκίνη, στο φουσιδικό οξύ, στη χλωραμφαινικόλη, στη τετρακυκλίνη ενώ διαθέτει και γονίδια ανθεκτικότητας στον ψευδάργυρο.

1.3.1.1 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες

Στο γένος *Salmonella* ανήκουν αρνητικά κατά Gram βακτήρια, κινούμενα με περίτριχες βλεφαρίδες, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Εξαιρέση αποτελούν οι *S. typhi*, *S. paratyphi* και *S. dublin*, που παράγουν ειδικό ελυτροειδές περίβλημα και οι *S. gallinarum*, *S. pullorum*, που είναι ακίνητες. Είναι προαιρετικά αναερόβια και έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν την τροφή τους, τόσο με την αναπνοή όσο και με τη ζύμωση. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται στην ευνοϊκή θερμοκρασία των 37° C. Η D- γλυκόζη και άλλοι υδρογονάνθρακες καταβολίζονται με τη παραγωγή οξέος και συχνά αερίου. Είναι αρνητικά βακτήρια στη δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στην δοκιμή της καταλάσης, αρνητικά στις δοκιμές της ινδόλης και τη Voges-Proskauer και θετικά στις δοκιμές ερυθρού του μεθυλίου και της χρησιμοποίησης των κιτρικών άλατων του Simmon (Holt, 1974). Παράγεται H₂S και δεν υδρολύουν την ουρία. Οι υδρογονάνθρακες που συνήθως ζυμώνονται είναι οι εξής:

- L- αραβινόζη μαλτόζη
- D-μανιτόλη
- D-μανόζη
- L- ραμνόζη
- D-σορβιτόλη
- Τρεαλόζη.

Τα στελέγχοι του γένους *Salmonella sp.* είναι εξαιρετικά ανθεκτικά και επιζούν ακόμη και όταν στερούνται των θρεπτικών συστατικών των απαραίτητων για το μεταβολισμό τους. Επιβιώνουν στην κατάψυξη. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανθεκτικότητα των *Salmonella* σε ορισμένες χρωστικές και χημικές ουσίες που

αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων. Αναπτύσσονται σε pH 4-9 και σε άλμη πυκνότητας μέχρι 7 έως 8% NaCl. Όπως σε όλα τα Gram-αρνητικά βακτηρίδια, το κυτταρικό τοίχωμα των *Salmonella* περιέχει λιποπολυσακχαρίτες. Με τη λύση των κυττάρων οι λιποπολυσακχαρίτες ελευθερώνονται και ενεργούν ως ενδοτοξίνες. *Salmonella* δεν παράγουν εξωτοξίνες και ο μηχανισμός παθογένειας τους φαίνεται ότι έχει σχέση με το O αντιγόνο τους που δρα ως ενδοτοξίνη (Holt, 2000).

1.4 Σκοπός

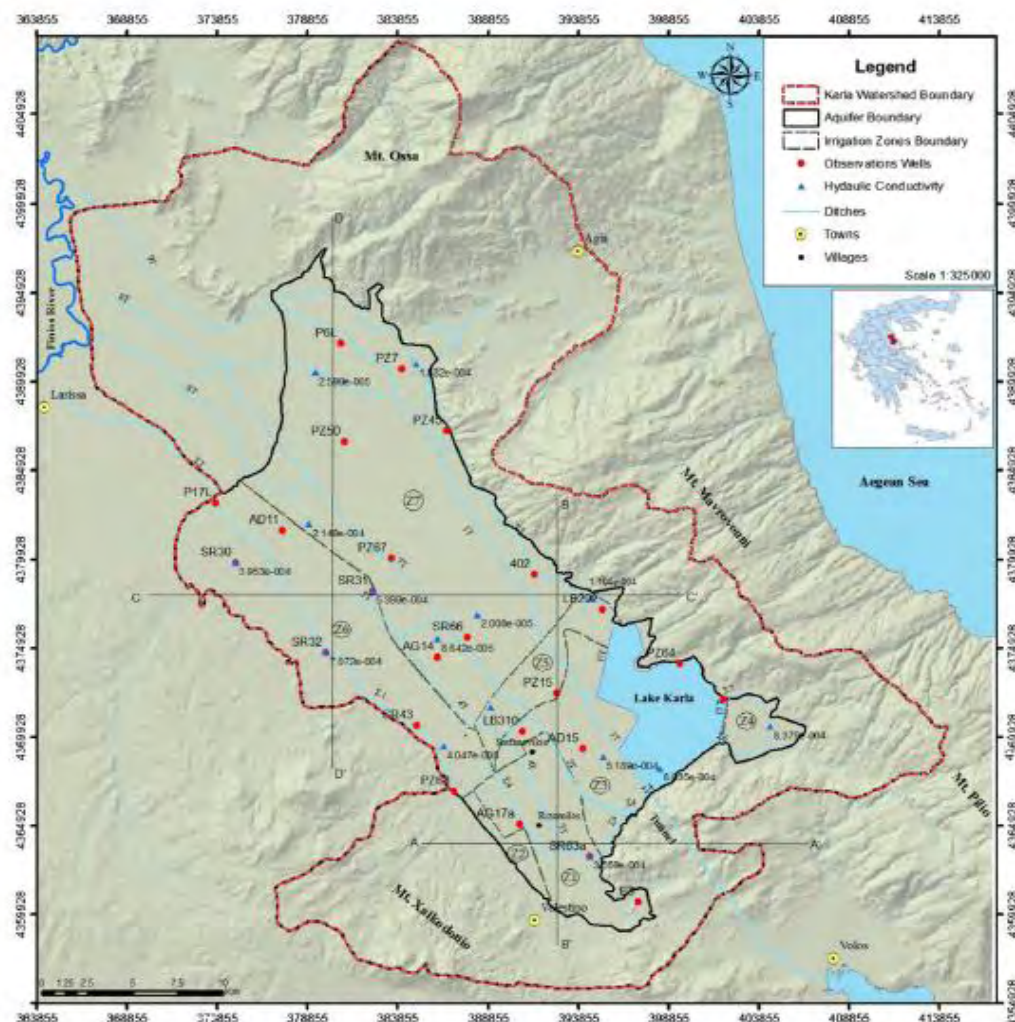
Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε το αν και κατά πόσο το παθογόνο βακτήριο *Salmonella spp.* που εντοπίστηκε στον ταμιευτήρα της λίμνης Κάρλας, μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε θαλασσινό νερό.

Για τον σκοπό αυτό κάναμε υγρές καλλιέργειες με θαλασσινό νερό από τον Άναυρο στην περιοχή του Βόλου. Οι υγρές καλλιέργειες εμβολιάστηκαν με νερό από τις τρεις περιοχές που συνδέονται με την λίμνη Κάρλα. Την τάφρο 2Τ από όπου το νερό εισέρχεται στον ταμιευτήρα, την περιοχή Κ που βρίσκεται στην λίμνη και την περιοχή Χ, που βρίσκεται στην βιομηχανική περιοχή του Βόλου και αποτελεί το τελευταίο προσβάσιμο σημείο πριν την κατάληξη των γλυκών νερών της Κάρλας στον Παγασητικό.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Περιοχή μελέτης

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγιναν όπως προηγουμένως αναφέρθηκε κυργές καλλιέργειες με θαλασσινό νερό από τον Άναυρο στην περιοχή του Βόλου. Οι υγρές καλλιέργειες εμβολιάστηκαν με νερό από τις τρεις περιοχές που συνδέονται με την λίμνη Κάρλα. Την τάφρο 2Τ, την περιοχή Κ που και την περιοχή Χ, που βρίσκεται στην βιομηχανική περιοχή του Βόλου.



Εικόνα 3: Χάρτης της λίμνης Κάρλας, αναφέρεται ο υδροφόρος ορίζοντας (Sidiropoulos et al. 2015)

2.2 Δειγματοληψία - Πείραμα

Τα δείγματα συλλέχθηκαν την περίοδο Απριλίου-Σεπτεμβρίου 2014 από 4 σταθμούς. Συνολικά συλλέχθηκαν 30,15 l θαλασσινού νερού και 1350 ml γλυκού νερού από τις περιοχές K, 2T και X (150 ml από την κάθε περιοχή σε κάθε δειγματοληψία), ενώ πραγματοποιήθηκαν συνολικά τρεις δειγματοληψίες.

Αμέσως μετά την δειγματοληψία τα δείγματα μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών και διηθήθηκαν. Το νερό από την περιοχή της εξόδου (X) διηθήθηκε με φίλτρο πόρου 11μm, ενώ το θαλασσινό νερό καθώς και αυτό των περιοχών 2T και K με φίλτρο πόρου 0,2 μm.

Εν συνεχεία τοποθετήσαμε σε 9 (τρεις για την κάθε περιοχή) φιάλες τύπου Duran που προηγουμένως είχαμε αποστειρώσει 450 ml θαλασσινού νερού σε κάθε μια από αυτές και τις τοποθετήσαμε στο αυτόκαυστο για 15 min σε θερμοκρασία 121°C, προκειμένου να αποστειρωθούν τα δείγματα. Έπειτα, αφού τα δείγματα έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (~ 25°C), εμβολιάζουμε με δείγματα από τις K, 2T και X, έτσι ώστε να έχουμε 3 φιάλες με δείγμα από την K, 3 από την 2T και 3 από τη X. Ανακινούμε τις καλλιέργειές μας και τοποθετούμε τις φιάλες στον επωαστή στους 37°C. Έπειτα από 48 ώρες παίρνουμε με την βοήθεια πιπέτας ποσότητα 1ml από κάθε φιάλη και κάνουμε επίστρωση σε τρυβλία Petri με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο Brilliant Green Agar (BGA). Τέλος τοποθετήσαμε τις υγρές καλλιέργειες και τα τρυβλία στον επωαστή στους 37°C. Έπειτα από 48 ώρες έγινε καταμέτρηση των πιθανών αποικιών σαλμονέλλας (αποικίες με μαύρο χρώμα). Επίσης έγινε αραιώση της τάξης 10^{-1} ml θαλασσινού νερού. Η καταμέτρηση των πιθανών αποικιών *Salmonella* μετά την αραιώση έγινε μετά από επίσης 48 ώρες.

Η απομόνωση, η διατήρηση και η απαρίθμηση των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα. Το υπόστρωμα περιέχει όλα εκείνα τα θρεπτικά που είναι απαραίτητα για την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών. Για να παρασκευαστεί στερεό θρεπτικό υπόστρωμα πρέπει να χρησιμοποιηθεί πηκτικός παράγοντας (Madigan et al.2003).

Με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης το αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό με άγαρ απλώνεται πρώτα σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri. Στη συνέχεια ακολουθεί η στερεοποίηση και η επώαση των τρυβλίων. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Brilliant Green Agar, το οποίο είναι θρεπτικό υλικό εξειδικευμένης χρήσης (εκλεκτικό) και επιτρέπει την αύξηση της σαλμονέλλας. Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος ζυγίστηκαν 25g BGA και προστέθηκαν σε 500ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό υλικό ανακινήθηκε με την βοήθεια θερμικού μαγνητικού αναδευτήρα για 15 λεπτά στους 121°C. Έπειτα τοποθετείται στο υδατόλουτρο για 5-10 λεπτά και τέλος απλώνεται στα τρυβλία.

2.3 Το θρεπτικό υλικό BGA

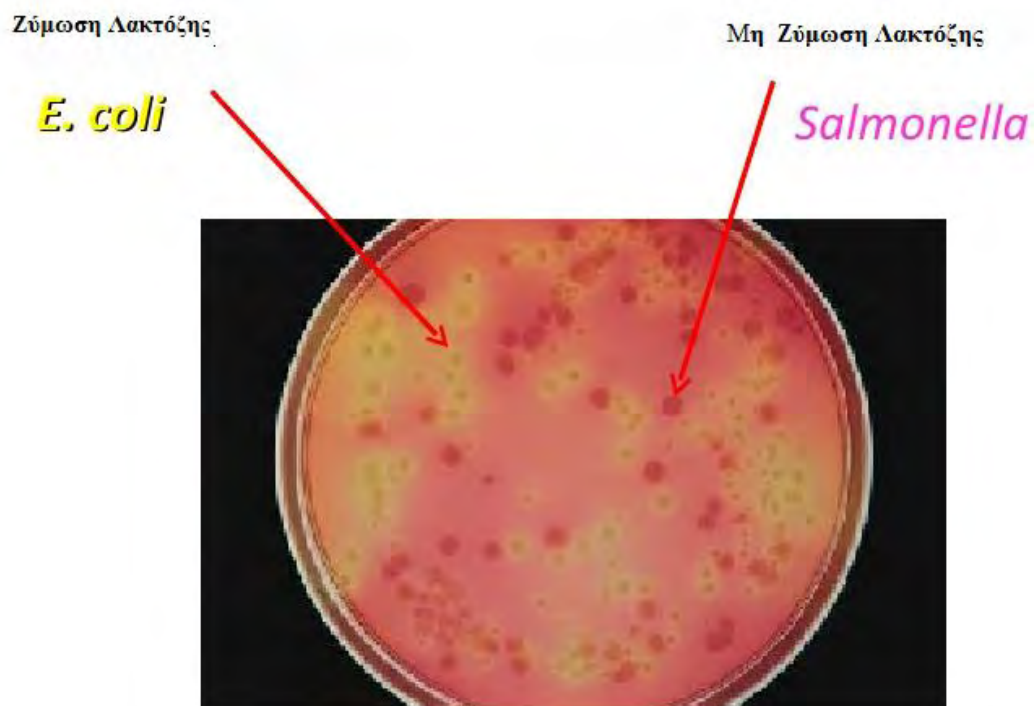
Οι Kristensen, et al., το 1925, πρώτοι περιέγραψαν τη χρήση του Brilliant Green Agar (BGA) ως πρωταρχικό μέσο για την απομόνωση της *Salmonella spp*, ενώ το 1935 ο Kauffmann τροποποίησε την φόρμουλα του BGA (Εικόνα 4), προκειμένου να δημιουργήσει ένα εξαιρετικά εκλεκτικό μέσο για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών *Salmonella* από τα κόπρανα και άλλα παθολογικά υλικά, καθώς και από τα τρόφιμα και γαλακτοκομικά προϊόντα.



Εικόνα 4: Θρεπτικό BGA σε τριβλίο Petri (VetBact)

2.3.1 Βασικές αρχές της διαδικασίας παραγωγής BGA

Το Brilliant Green είναι όπως προαναφέρθηκε ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό, που αναστέλλει τα gram-θετικά βακτήρια και τους περισσότερους gram- αρνητικούς βάκιλλους για την επιλεκτική απομόνωση ειδών *Salmonella*, με εξαίρεση τα είδη *Salmonella typhi* και *Salmonella paratyphi*. Το BGA περιέχει ερυθρό της φαινόλης ως δείκτη του pH και Brilliant Green ως ανασταλτικός παράγοντας. Οι οργανισμοί που ζυμώνουν τη λακτόζη παρουσιάζουν κίτρινες αποικίες, ενώ το *Salmonella* παρουσιάζεται με σκούρο έως ανοιχτό κόκκινο (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Αποκίες *E. Coli* και *Salmonella spp.* σε BGA (Sandeep Patil, 2012)

Πίνακας 1: Συστατικά BGA ανά λίτρο απιονισμένου ύδατος(οι δόσεις των συστατικών, μπορούν να προσαρμοστούν, προκειμένου να πληρούνται τα κριτήρια απόδοσης):

Λακτόζη	10,0 gm
Σουκρόζη	10,0 gm
Χλωριούχο νάτριο	5,0 gm

Pancreatic Digest of Casein	5,0gm
Peptic Digest of Animal Tissue	5,0gm
Εκχύλισμα ζύμης	3,0gm
Ερυθρότης φαινόλης	0,08gm
BrilliantGreen	12,5 gm
Άγαρ	20,0 gm

(οι δόσεις των παραπάνω συστατικών, μπορούν να προσαρμοστούν, προκειμένου να πληρούνται τα κριτήρια απόδοσης)

2.4 Στατιστική επεξεργασία

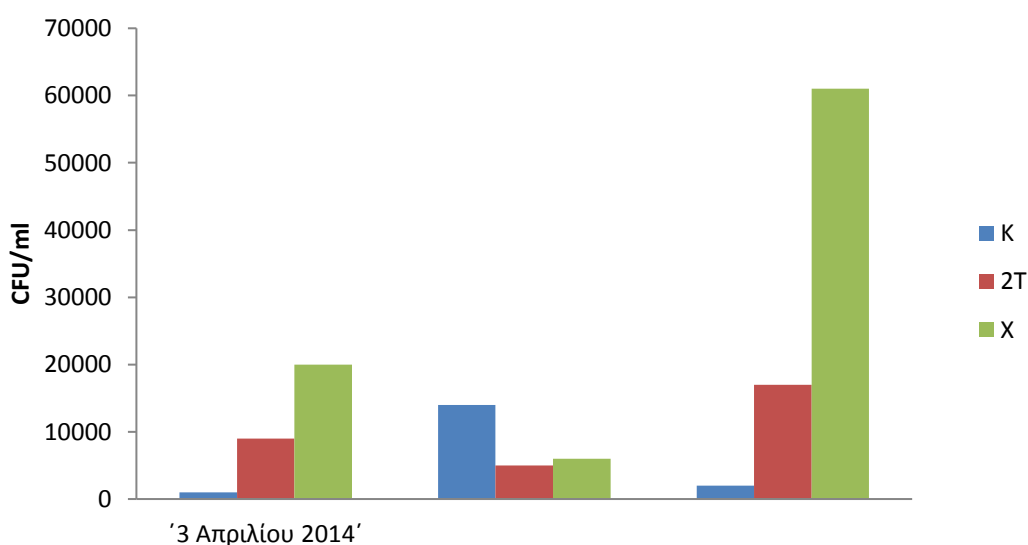
Η μέτρηση του πλήθους των αποικιών έγινε με την απευθείας μέτρηση του αριθμού τους.

Σχετικά με την στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο του Microsoft excel για τον έλεγχο της ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (One Way Anova), προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει η όχι στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ενδιαιτημάτων. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε σύγκριση κατά ζεύγη (t-test) για να διερευνηθεί η ύπαρξη πιθανών διαφορών με όλους τους δυνατούς συνδυασμούς.

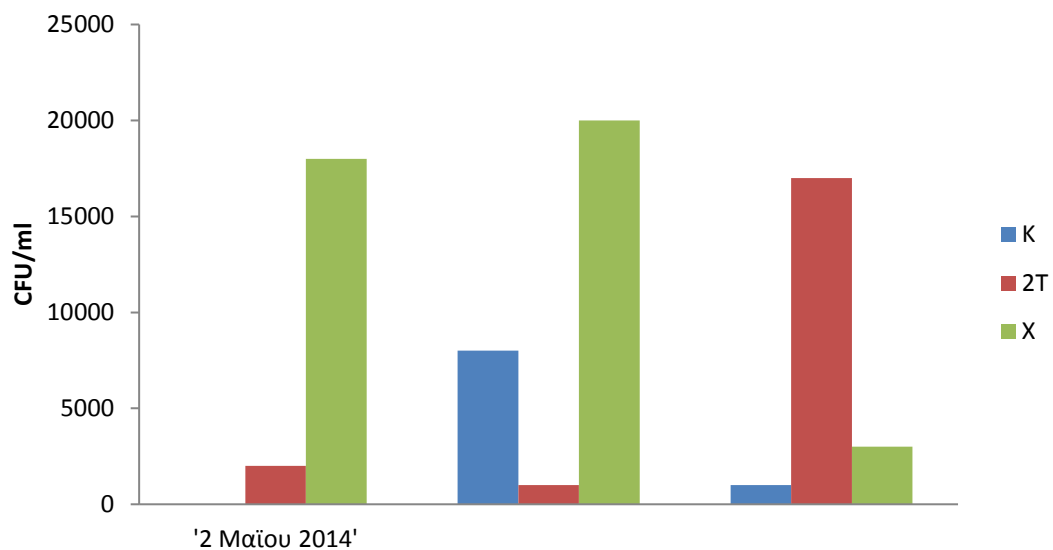
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αναφορικά με την επιβιωσιμότητα, το στέλεχος στην πρώτη φάση του πειράματος, όπου τα δειγματά δεν είχαν αραιωθεί εμφάνισε αποικίες έπειτα απο 48 ώρες μετά τον εμβολιασμό και στις τρεις περιοχές μελέτης (2T, K, X) για την θερινή περίοδο. Αντίθετα, η επανάληψη του πειράματος κατά την φθινοπωρινή περίοδο έδειξε μηδενική επιβιωσιμότητα, καθώς δεν βρέθηκαν αποικίες στα τριβλία μετά το πέρας 48 ωρών από τον εμβολιασμό. Επομένως, όλα τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας που θα ακολουθήσουν και για τις δύο φάσεις του πειράματος, αφορούν τις δύο πρώτες δειγματοληψίες, που πραγματοποιήθηκαν στις 3 Απριλίου και 2 Μαΐου του 2014. Επιπλέον τόσο η ανάλυση διακύμανσης όσο και το T test έδειξαν μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα της αναραιγής φάσης του πειράματος για τις δύο επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν, φαίνονται στο γράφημα του **Σχήματος 1** και **2** αντίστοιχα.



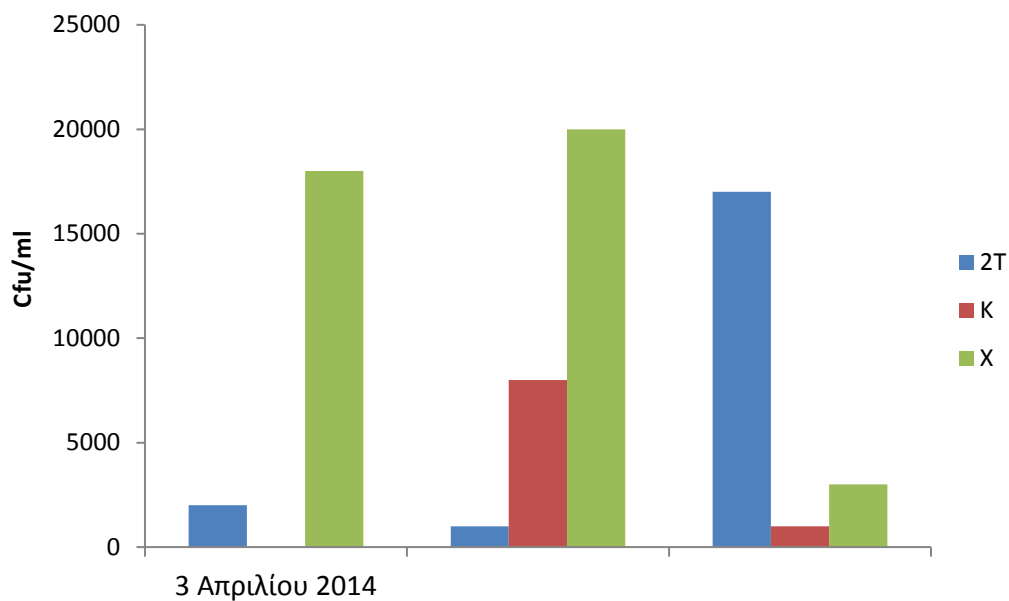
Σχήμα 1: Αποικίες *Salmonella sp* από την τάφρο (2T) τη λίμνη Κάρλα (K) και την αποστραγγιστική τάφρο (X) στις 3 Απριλίου 2014.



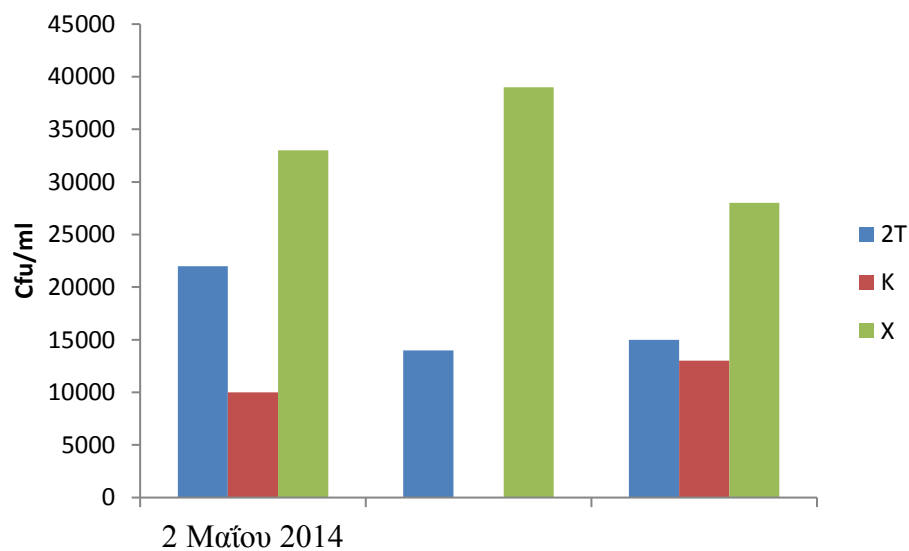
Σχήμα 2: Επιβιωσιμότητα *Salmonella sp.* από τις τρεις περιοχές μελέτης (2T, K, X) στις 2 Μαΐου 2014.

Από τα γράφηματα του (Σχήματος 1 και 2) βλέπουμε πως το στέλεχος *Salmonella* εισέρχεται στο ταμιευτήρα της λίμνης Κάρλας από την περιοχή 2T παραμένει στο σταθμό K σε χαμηλότερα ποσοστά και στο σταθμό X, που αποτελεί το τελευταίο προσβάσιμο σημείο πριν το νερό της λίμνης καταλήξει στον Παγασητικό, βλέπουμε αυξημένη επιβιωσιμότητα.

Στη δεύτερη φάση του πειράματος, πραγματοποιήθηκε αραιώση της τάξεως 10^{-1} με θαλασσινό νερό στα αρχικά δείγματα, αμέσως μετά την πρώτη καταμέτρηση των αποικιών στα τριβλία και έγινε επίστρωση 1μl αραιωμένου δείγματος σε τριβλία με θρεπτικό BGA. Μετά από 48 ώρες στον επωαστή έγινε η καταμέτρηση των αποικιών. Τα αποτελέσματα από την καταμέτρηση των αποικιών *Salmonella* εκφρασμένα σε CFU/ml, για τα αραιωμένα δείγματα, φαίνονται στο ραβδόγραμμα του **Σχήματος 3** για τις 3 Απριλίου 2014 και σε αυτό του **Σχήματος 4** για τις 2 Μαΐου 2014 (μέγιστη τιμή 40,000 CFU/ml στα δείγματα από την περιοχή X).



Σχήμα 3: Αριθμός αποικιών (colony forming units) *Salmonella sp.* στα αραιωμένα δείγματα από τις περιοχές 2T, K και X.



Σχήμα 4: Αριθμός αποικιών (cfu) *Salmonella sp.* στα αραιωμένα δείγματα από τις περιοχές μελέτης (2T, K, X) για τις 2 Μαΐου 2014

Στελέχοι *Salmonella sp.* έχουν απομονωθεί από πηγές νερού (Cherry et al. 1972, Arvanitidou et al. 1997), που χρησιμοποιούνται ως βακτηριακοί ταμιευτήρες, προάγοντας την μετάδοση του βακτηρίου σε άλλους ξενιστές μέσω του υδροφόρου ορίζοντα (Foltz, 1969). Το βακτήριο *Salmonella sp.* απελευθερώνεται στο περιβάλλον τόσο από ανθρώπους όσο και από ζώα, ανεξαρτήτως από το αν αυτά είναι ζώα συντροφιάς ή αγροκτήματος (Baudart et al. 2000). Παρά τις προσπάθειες για συγκράτηση και αποστείρωση των ανθρώπινων αποβλήτων το *Salmonella* μπορεί να επιβιώσει 10- 15 ημέρες σε ένα ασηπτικό σύστημα. Η διαρροή νερού από σηπτικές δεξαμενές, συστήματα αποχέτευσης καθώς και από τις όμβριες απορροές διευκολύνει το πέρασμα του βακτηρίου σε επιφανειακά νερά (Baudart et al. 2000, Paul et al. 1995). Η ανίχνευση *Salmonella* σχετίζεται με την απόσταση της πηγής νερού, που χρησιμοποιείται ως περιοχή δειγματοληψίας, σε σχέση με την περιοχή εκκένωσης των αποχρευματικών λυμάτων (Alonso et al. 1992, Baudart et al. 2000). Σύμφωνα με Cherry et al. 1972 το βακτήριο *Salmonella* απομονώθηκε από το 65% των δειγμάτων νερού που συλλέχθηκαν κατά μήκος του Peavine Creek στην πόλη Decatur στην πολιτεία της Τζόρτζιας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής, που ρέει μέσα από κατοικημένες και βιομηχανικές περιοχές. Επιπλέον *Salmonella* ανιχνεύθηκε 350 μέτρα κάτω από την επιφάνεια ενός μικρού ρέματος, στην ίδια περιοχή, υποδηλώνοντας έτσι το γεγονός ότι η επιμόλυνση των υδάτων με το παθογόνο βακτήριο γίνεται αμέσως μόλις το νερό βγεί από τη γη.

Συγκριτικά με άλλα βακτήρια, το *Salmonella* εμφανίζει υψηλές τιμές επιβιωσιμότητας στο υδάτινο περιβάλλον (Chao et al. 1987). Η παρουσία του συγκεκριμένου παθογόνου σε θαλάσσια περιβάλλοντα δεν ποικίλει εποχιακά και είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας του νερού (Alonso et al. 1992).

Επιπλέον, σύμφωνα με Mezrioui et al. (1995) το *Salmonella* εμφανίζει υψηλό ποσοστό επιβιωσιμότητας μετά την ανάμειξη απορροών γλυκού νερού με αυτό της θάλασσας. Επομένως το βακτήριο αυτό είναι ανεκτικό σε περιβαλλοντικές διακυμάνσεις, όπως σε αυξημένες τιμές αλατότητας και υψηλής οσμωτικής πίεσης. Οι Abdel-Monem et al. (1990) & Chao et al. (1987) υποστηρίζουν ότι το παθογόνο βακτήριο μπορεί να διαδοθεί μέσω του ιζήματος και του εδάφους, ακόμα και με την απουσία δραστικών λιπασμάτων, σαν αποτέλεσμα των υδάτινων ρευμάτων, των υπόγειων πηγών αλλά και των βρόχινων απορροών.

Έρευνες έχουν δείξει ότι το *Salmonella* ανιχνεύεται συχνά σε περιβαλλοντικά δείγματα που συλλέγονται τόσο σε γεωργικές περιοχές όσο και σε χώρους αναψυχής (Abdel-Monem et al. 1990), ενώ μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να επιβιώσει για τουλάχιστον ένα χρόνο σε αυτά τα οικοσυστήματα (Davies and Wray, 1996).

Αναφορικά, με τη λίμνη Κάρλα η Tsotskou (2016) εντόπισε το στέλεχος *Salmonella entericenteric typhimurium* και μελέτησε την επιβιωσιμότητα του, που για τους θερινούς μήνες ήταν αυξημένη και έφτανε έως και τις 14 ημέρες ενώ τους θερινούς μήνες το στέλεχος δεν παρουσίασε κάποια αύξηση. Έχοντας ως έναυσμα την παραπάνω εργασία θελήσαμε να ελέγξουμε το αν και κατά πόσο το βακτήριο *Salmonella sp.* που θεωρούμε ότι υπάρχει στη λίμνη θα μπορούσε να επιβιώσει σε υγρές καλλιέργειες με υφάλμυρο νερό. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη επιβιωσιμότητα κατά τους θερινούς και μηδενική για την φθινοπωρινή περίοδο διεξαγωγής του πειράματος.

Ανατρέχοντας στην υπάρχουσα βιβλιογραφία βρήκαμε μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι οι επιδράσεις της θερμοκρασίας, του pH, και της ενεργότητας νερού (a_w) είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους όταν αναφερόμαστε στο ρυθμό μικροβιακής

αύξησης (McMeekin et al. 2000, Presser et al. 1998). Ωστόσο οι Koutsoumanis et al. (2004) απέδειξαν πως υπάρχει συνεργαστική επίδραση των τριών αυτών παραγόντων στα όρια αύξησης του *Salmonella*. Επιπλέον η βακτηριακή αύξηση στα υδάτινα οικοσυστήματα επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, όπως από την ύπαρξη πρωτοζώων, το ποσοστό της οργανικής ύλης, την ύπαρξη τοξινών, τα διαλυμένα θρεπτικά, την υπερϊώδης ακτινοβολία καθώς και τα βαρέα μέταλλα (Percival et al. 2013). Επομένως το γεγονός της μηδενικής επιβιωσιμότητας, δεν υποδηλώνει απαραίτητα τη λειτουργία της θερμοκρασίας ως περιοριστικού παράγοντα στην επιβιωσιμότητα του *Salmonella sp.* καθώς είναι πιθανό να εξαρτάται από ένα συνδυασμό περιβαλλοντικών και άλλων παραγόντων, οι οποίοι δεν ήταν οι κατάλληλοι τη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας έδειξαν αυξημένη επιβιωσιμότητα του *Salmonella* στα δείγματα που συλλέχθηκαν από την αποστραγγιστική τάφρο Χ. Η συγκεκριμένη τάφρος αποτελεί όπως έχει αναφερθεί το τελευταίο προσβάσιμο σημείο πριν το νερό της λίμνης Κάρλας καταλήξει στη θάλασσα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με αποτελέσματα έρευνας που διεξήχθηκε το 2010 στην περιοχή Etueffont στη Γαλλία, ενισχύουν την άποψη ότι το συγκεκριμένο βακτήριο μπορεί να μεταφέρεται μέσω του υδροφόρου ορίζοντα, ενώ παράλληλα είναι ικανό να επιβιώσει αρκετές ευδομάδες σε ξήρες συνθήκες και μέχρι αρκετούς μήνες στο νερό (Grisey et al. 2013).

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας που παρουσιάστηκαν παραπάνω, μπορούμε να πούμε πως το στελέχος *Salmonella* που προέρχονταν από την αποστραγγιστική τάφρο (σταθμός δειγματοληψίας X), όσον αφορά τις δειγματοληψίες Απριλίου - Μαΐου 2014, εμφάνισε αυξημένη επιβιωσιμότητα έναντι των υπόλοιπων σταθμών δειγματοληψίας (K, 2T). Αντιθέτως κατά την φθινοπωρινή περίοδο δεν παρατηρήθηκε καμία αύξηση του στελέχους. Το γεγονός αυτό δεν θα πρέπει να δηλώνει απαραίτητα τη λειτουργία της χαμηλής θερμοκρασίας ως περιοριστικό παράγοντα για την επιβιωσιμότητα του *Salmonella*. Αυτό καθώς η επιβιωσιμότητα του στελέχους πιθανόν να εξαρτάται από ένα συνδυασμό περιβαλλοντικών παραγόντων (ύπαρξη τοξινών, θερμοκρασία, διαλυμένα θρεπτικά κ.α.), οι οποίοι δεν ήταν κατάλληλοι την χρονική στιγμή που συλλέχθηκαν τα δείγματα νερού.

Η αυξημένη επιβιωσιμότητα του στελέχους στο σταθμό X, καθώς και η συνεχής παρουσία του στα δείγματα από τους σταθμούς K και 2T, μπορεί να υποδηλώνει τη μεταφορά του *Salmonella* μέσω του υδροφόρου ορίζοντα. Ωστόσο δεν μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα ότι η αυξημένη παρουσία του στελέχους στα δείγματα της αποστραγγιστικής τάφρου οφείλονται αποκλειστικά στο στελέχος που εντοπίστηκε στη λίμνη Κάρλα. Αυτό εξαιτίας της θέσης του συγκεκριμένου σταθμού, καθώς είναι πιθανό τα αστικά και αγροτικά λύματα που δέχεται να φέρουν στελέχη του *Salmonella*.

Για τους λόγους αυτούς θα ήταν απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της επιβιωσιμότητας του *Salmonella* και των μηχανισμών με τους οποίους επιτυγχάνεται

τόσο στο υδάτινο οικοσύστημα της λίμνης Κάρλα, όσο και σε υφάλμυρα οικοσυστήματα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία:

- Abdel-Monem, M. H. A. A., and A. Dowidar. 1990. Recoveries of *Salmonella* from soil in eastern region of Saudi Arabia Kingdom. J.Egypt. Public Health Assoc. 65:61–75.
- Alonso, J. L., M. S. Botella, I. Amoros, and A. Rambach. 1992. *Salmonella* detection in marine waters using a short standard method. Water Res. 26:973–978.
- Arvanitidou, M., A. Papa, T. C. Constantinidis, V. Danielides, and V. Katsouyannopoulos. (1997). The occurrence of *Listeria spp.* and *Salmonella spp.* in surface waters. Microbiol.Res152 , 395-397.
- Azam F. (1998) Microbial Control of Oceanic Flora: The Plot Thikens, Science. 208:694-696.
- Baudart, J., K. Lemarchand, A. Brisabois, and P. Lebaron. 2000. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. Appl. Environ. Microbiol. 66:1544–1552.

- Chao, W., R. Ding, and R. Chen. 1987. Survival of pathogenic bacteria in environmental microcosms. *Chinese J. Microbial Immunol.* (Taipei) 20: 339–348.
- Chamoglou M., Papadimitriou T., Kagalou I. (2014) Key-Descriptors for the Functioning of a Mediterranean Reservoir: The Case of the New Lake Karla-Greece. *Environ. Process.* 1:127-135.
- Cherry, W. B., J. B. Hanks, B. M. Thomason, A. M. Murlin, J. W. Biddle, and J. M. Croom. 1972. Salmonellae as an index of pollution of surface waters. *Appl. Microbiol.* 24:334–340.
- Davies, R. H., and C. Wray. 1996. Seasonal variations in the isolation of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from environmental samples. *J. Vet. Med. Ser. B* 43:119–127.
- Foltz, V. D. 1969. *Salmonella* ecology. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 46:222–224.
- Holt J. G. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 4th ed. Williams & Wilkins (Baltimore), 253-268 & 341-353.
- Holt J. G. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. Williams & Wilkins (Baltimore), 310-328 & 551-563.
- Koutsoumanis K.P., Kendall P.A., Sofos J.N. (2004) Modeling the Boundaries of Growth of *Salmonella Typhimurium* in Broth as a Function of Temperature, Water Activity, and pH, *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 1, 2004, Pages 53–59 International Association for Food Protection.
- Kristensen M., Lester V. and Jurgens A. (1925) On the use Trypsinised case in, Brom-Thymoblue, Brom-Cresol-Purple, Phenol-Red and BRILLIANT-GREEN for Bacteriological Nutrient Media. *Brit. J. Exp. Pathol.* 6. 291-297.

- McMeekin T. A., Presser K., Ratkowsky D. A., Ross T., Salter M., Tienungoon S. (2000) Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/no growth interface. *Int. J. Food Microbiol.* 55:93–98.
- Mezrioui, N., B. Baleux, and M. Trousselier. 1995. A microcosm study of the survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in brackish water. *Water Res.* 29:459–465.
- Paul, J. H., J. B. Rose, S. Jiang, C. Kellogg, and E. A. Shinn. 1995. Occurrence of fecal indicator bacteria in surface waters and the subsurface aquifer in Key Largo, Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2235–2241.
- Percival S.L., Yates M. V., Williams D.W., Chalmers R.M., Gray N.F. (2013) *Microbiology of waterborne diseases: microbiological aspects and risks*. London: Elsevier.
- Presser K. A., Ross T., Ratkowsky D.A. (1998) Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1773–1779.
- Sidiropoulos P., Mylopoulos N., Loukas A., (2015) Stochastic Simulation and Management of an Over-Exploited Aquifer Using an Integrated Modeling System, *Water Resour Manage* 29:929–943.
- Vasiliades L., Loukas A., Patsonas G. (2009) Evaluation of a statistical downscaling procedure for the estimation of climate change impacts on droughts. *Natural Hazards and Earth System Sciences* 9, 879–894.
- Vassos D. V. (2004) Foods & health of the consumer. Food disturbances. 1st ed Papasotiriou (Athens), 39-68.
- Mezrioui, N., Baleux, B., & Troussellier, M. (1995). A microcosm study of the survival

of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in brackish water. *Water Research*, 29(2), 459–465.

- Grisey, E. et al., 2010. Survival of pathogenic and indicator organisms in groundwater and landfill leachate through coupling bacterial enumeration with tracer tests. *Desalination*, 261(1–2), pp162–168.

Ελληνική βιβλιογραφία:

- Μαυρίδου Α., Παπαπετροπούλου Μ. (1995) Μικροβιολογία υδάτινου περιβάλλοντος. Τραυλός-Κωσταράκη, Αθήνα, σελ 222.
- Theologoul. (2014) Εκτίμηση και χαρτογράφηση ποιοτικών χαρακτηριστικών σε υδάτινους αποδέκτες με τεχνικές τηλεπισκόπησης: Η περίπτωση της λίμνης Κάρλα. Διπλωματική διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, σελ 106.
- Πακάκη Β. & Ευστρατίου Μ. Α. (2005) Επίδραση βροχοπτώσεων στο μικροβιακό φορτίο νερών αναψυχής. Διπλωματική διατριβή, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, σελ 53.
- Τσότσκου Α. (2016) Επιβιωσιμότητα ενός στελέχους *Salmonella* σε νερό της λίμνης Κάρλα. Προπτυχιακή Διπλωματική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ 36.

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία:

- Gialis S. & Laspidou C.S (2014) Lake Karla and the contradictory character of Greek Environmental Policies: A brief historical overview. ResearchGate
- Sandeep Patil (2012) Biocemical Tests and Diagnostic Media. Published on Jul 21, 2012 <http://www.slideshare.net/SandeepPatil31/diff-mediasv>

- Thermo Scientific, Oxoid Microbiology Products

[http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0263&org=124=UK
&lang](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0263&org=124=UK&lang)

6. ABSTRACT

Title: Spatial variability of *Salmonella* spp. In the Karla Reservoir, Greece

The purpose of this research was to study the spatial differentiation of the *Salmonella* spp. in the Karla's Reservoir and in addition, the survivability of this strain in brackish water. Overall, four water samples took place. Three of them were collected from different areas of the reservoir respectively. The fourth water sampling was picked from Pagasitikos Gulf and more specifically from the area of Anavros beach.

The strain exhibited increased survivability in the samples, which were injected with water from the drainage ditch (Station X), during the first two phases. The first phase of the experiment was undiluted and the second was conducted with a dilution of around 10^{-1} ml sterile sea water in primary cultures. The third iteration of the experiment took place in September 2014 and it revealed zero survivability of the bacterium at both first and second experimental stages, for all three stations (K, 2T, X).

Statistical analysis of the collected data, demonstrated that there is no significant difference between the measurements.

Keywords: *Salmonella*, survivability, lake Karla, brackish water, aquifer